 doi 10.3969/j.issn.1673-4254.2016.11.15 J South Med Univ, 2016, 36(11): 1536-1540

基础研究

胆碱与帕瑞昔布钠的协同镇痛作用及其机制

张 娜[1],冯泽国[1],王汝欢[3],张卫东[1],余 军[1],杜春彦[1],汪 海[2]
[1]解放军总医院麻醉手术中心,北京 100853;[2]军事医学科学院卫生与环境医学研究所,北京 100850;[3]北京赛德维康医药研究院,北京 100039

摘要:目的 探讨胆碱和帕瑞昔布钠在镇痛中的相互作用并对其机制进行初步研究。**方法** 醋酸扭体模型:将150只雄性昆明小鼠随机分为4组:(1)对照组(S)(n=10):尾静脉注射0.9%的生理盐水0.2 mL/20 g;(2)胆碱组(C)(n=50):50只小鼠设立5个剂量即3、6、12、24、48 mg/kg;(3)特耐组(P)(n=50):50只小鼠设立5个剂量即1.5、3、6、12、24 mg/kg;(4)联合用药组(C+P)(n=40):40只小鼠设立4个剂量,分别为两药ED_{50}的1/2、1/4、1/8、1/16,进而可求出两药合用时的ED_{50}。所有药物均在造模前经尾静脉给予。胆碱给药时间为造模前2 h,帕瑞昔布钠为30 min。研究生理盐水对照组(S)、ED_{50}胆碱组(C)、ED_{50}帕瑞昔布钠组(P)、以及1/2ED_{50}胆碱和帕瑞昔布钠组[1/2(C+P)]对醋酸扭体模型小鼠血中细胞因子和炎症介质的影响。药物预处理时间同上,在腹腔给予醋酸后10 min立即实施摘眼球采血。所采血液采用ELISA试剂盒检测IL-1、TNF-α、PGE_2、NF-kB、I-kB的含量。**结果** (1)醋酸扭体模型中,胆碱和帕瑞昔布钠单独经尾静脉给药后所得的ED50,胆碱8.64 mg/kg,帕瑞昔布钠6.33 mg/kg;二者联合用药时胆碱为2.13 mg/kg,帕瑞昔布钠为1.56 mg/kg;(2)在等辐射图见胆碱与帕瑞昔布钠合用时的ED_{50}实测值落在理论值的下方,两点作t检验的P<0.05。联合用药指数CI<0.9;(3)与S组比较,C组、P组、1/2(C+P)组中IL-1、TNF-α的含量均降低(P<0.05),且1/2(C+P)组比C组及P组分别单独使用降低更加明显(P<0.05);P组以及1/2(C+P)组中PGE2含量较对照组均有降低(P<0.05),1/2(C+P)组与C组相比PGE2含量下降更多(P<0.05);与S组相比,NF-kB的含量在C组、P组、1/2(C+P)组中均降低(P<0.05),I-kB的含量在1/2(C+P)组及C组中出现有统计学意义的降低,NF-kB、I-kB在1/2(C+P)组中较P组有更明显降低(P<0.05)。**结论** 胆碱与帕瑞昔布钠具有协同镇痛作用,二者的相互作用可能与体内NF-kB的表达有关

关键词:胆碱;帕瑞昔布钠; ED_{50};NF-kB

Synergistic analgesic effect of choline and parecoxib sodium in mice and the mechanism

ZHANG Na[1], FENG Zeguo[1], WANG Ruhuan[3], ZHANG Weidong[1], YU Jun[1], DU Chunyan[1], WANG Hai[2]
[1]Anesthesia and Operation Center, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China; [2]Institute of Health and Environmental Medicine, Academy of military Medical Science, Beijing 100850, China; [3]Thadweik Academy of Medicine, Beijing 100039, China

Abstract: Objective To investigate the synergistic analgesic effect of choline and parecoxib sodium and study its mechanism. **Methods** In male Kunming mice with acetic acid-induced writhing, the ED_{50} of choline and parecoxib sodium (administered via the tail vein at 2 h and 30 min before modeling, respectively) and their combined use were determined. In saline (control) group, ED50 choline (C) group, ED_{50} parecoxib sodium (P) group, and 1/2ED_{50} choline and parecoxib sodium (1/2[C+P]) group, blood samples were collected from the eyeball 10 min after intraperitoneal administration of acetic acid to detect the levels of IL-1, TNF-*α*, PGE_2, NF-kB, and I-kB levels using ELISA kits. **Results** In the acetic acid-induced writhing model, the ED_{50} of choline and parecoxib sodium was 8.64 and 6.33 mg/kg, and when combined, their ED_{50} was 2.13 and 1.56 mg/kg, respectively. The isobolograms of parecoxib sodium and choline showed that the measured ED_{50} of the two drugs combined was below the theoretical ED_{50} value (P<0.05) with a combination index (CI) of <0.9. Compared with the control group, C group, P group, and 1/2 (C+P) group all showed significantly lowered IL-1 and TNF-*α* levels (P<0.05), especially in 1/2 (C+P) group (P<0.05). PGE_2 level was significantly lower in P group and 1/2 (C+P) group compared with the control group (P<0.05). NF-κB and I-κB levels were significantly lowered in C, P, and 1/2 (C+P) groups (P<0.05), and the reduction was the most obvious in 1/2 (C+P) group (P<0.05). **Conclusion** Choline and parecoxib sodium has a synergistic analgesic effect, and their interactions may involve the *in vivo* expression of NF-κB.

Key words: choline; parecoxib sodium; ED_{50}; nuclear factor-κB

疼痛是由伤害性刺激产生通过神经系统传递到大脑中的复杂的感觉体验[1]。它严重影响着人类的身心健康。手术后疼痛是临床麻醉医师最常关注的急性疼痛[2]。帕瑞昔布钠现已是临床上较为理想的非甾体

收稿日期:2016-08-29
作者简介:张 娜,硕士研究生,E-mail: 15326711967@163.com
通信作者:冯泽国,硕士生导师,主任医师,电话:010-66931590,E-mail: Beijing_301@sina.com

类抗炎镇痛药,用于临床各科术后镇痛,但仍有一定的副作用,加大剂量会出现胃肠道系统等一系列不良反应[3-4]。联合用药镇痛是目前临床上广泛使用的镇痛方法,通过联合应用不同作用机制的镇痛药物,利用其累加或协同作用,获得最佳疗效[5]。胆碱能抗炎通路(cholinergic anti-inflammatory pathway, CAP)是一种新的炎症调节机制,CAP是抗炎信号通过释放的乙酰胆碱与巨噬细胞等免疫细胞上表达的α7烟碱型乙酰胆碱受体(α7nAChR)结合,抑制促炎性细胞因子释放从而起到抗炎镇痛的作用[6]。胆碱是α7nAChR特异性激动剂,可以通过激活α7受体抑制多种促炎细胞因子的释放,在不同的炎性疼痛模型上起到镇痛作用。研究发现胆碱能系统可能与花生四烯酸代谢通路存在相互影响[7]。但目前尚无有关二者相互作用的研究。本实验通过将帕瑞昔布钠与胆碱联合用于醋酸扭体模型,判断两药是否具有协同镇痛作用,并对其机制进行探索。

1 材料和方法

1.1 实验动物

昆明小鼠,雄性,6~8周龄,体质量18~22 g,由军事医学科学院实验动物中心提供(动物合格证号:SCXK-军2002-001),且已通过解放军总医院伦理委员会审查。适应环境2 d,分笼饲养,室温20~25 ℃,湿度60%~70%,空气新鲜,通风良好,自由摄食、饮水。

1.2 实验材料

重酒石酸胆碱(上海阿拉丁生物科技股份有限公司,CAS号:87-67-2),注射用帕瑞昔布钠(规格:40 mg,美国Pfizer Ltd,批号:J20080044),醋酸(国药集团化学试剂有限公司,批号:20150616),0.9%生理盐水注射液(石家庄四药有限公司,河北),药品储存条件为4 ℃。

1.3 实验模型建立及分组

醋酸扭体实验模型制备:将0.6%的醋酸溶液注入小鼠腹腔内,0.2 mL/10 g,刺激脏层和壁层腹膜,引起深部较大面积较长时间的炎性疼痛,致使小鼠出现腹部内凹、躯干与后肢伸张,臀部高起等行为反应,称为扭体反应。以注射后20 min内发生扭体次数作为疼痛定量指标。分为4组:(1)对照组S(n=10):尾静脉注射0.9%的生理盐水0.2 mL/20 g;(2)胆碱组C(n=50):50只小鼠设立5个剂量即3、6、12、24、48 mg/kg;(3)特耐组P(n=50):50只小鼠设立5个剂量即1.5、3、6、12、24 mg/kg;(4)联合用药组(C+P)(n=40):将两药ED_{50}的1/2、1/4、1/8、1/16合用,即可求出两药合用时的ED_{50}。所有药物均在造模前经尾静脉给予。胆碱给药时间为造模前2 h,帕瑞昔布钠为30 min。

1.4 醋酸扭体模型中用ELISA法检测小鼠血清中IL-1、TNF-α、PGE2、NF-kB、I-kB的含量

取40只小鼠随机分为4组:生理盐水对照组(S)、ED_{50}胆碱组(C)、ED_{50}帕瑞昔布钠组(P)、以及1/2ED_{50}胆碱和帕瑞昔布钠组1/2(C+P)。药物预防同上,在腹腔给予醋酸10 min后立即实施摘眼球采血,各组以及组内的小鼠从给予醋酸至取血的时间一致。所采血液3000 r/min离心10 min,小心吸取上层血清,1.5 mL EP管分装,−70 ℃冻存。一个月内完成采用ELISA试剂盒检测IL-1、TNF-α、PGE2、NF-kB、I-kB的含量。

1.5 统计学处理

采用SPSS 22.0统计学软件进行分析,计量资料以均数±标准误表示,组间比较采用单因素方差分析,P<0.05为差异有统计学意义。ED_{50}和95%可信区间用logistics回归求得。理论上相加点的ED_{50}与实测点的ED_{50}采用t检验进行比较。

2 结果

2.1 胆碱和帕瑞昔布钠的镇痛效果及其相互作用

在醋酸扭体实验模型中,胆碱和帕瑞昔布钠经尾静脉给药后所得的ED_{50}和95%可信区间(表1),等辐射分析图[8](图1)中理论上相加点的ED_{50}与实测点的ED_{50}相比差异有统计学意义(P<0.05);并且通过CalcuSyn2.0软件,根据Zheng等[9]人推导的多药物效应方程计算其联合用药指数CI<0.9(表2),所以可证明两药具有协同镇痛作用。

表1 胆碱和帕瑞昔布钠的镇痛效应的ED_{50}值和95%可信区间

Tab.1 ED_{50} values and 95% confidence limits (CL) for the antinociceptive effect of choline and Parecoxib

Drug	ED_{50} (CL)
Choline	8.64（7.99-9.29）
Parecoxib	6.33（6.03-6.63）
Choline+Parecoxib	2.13/1.56（1.93/1.46-2.33/1.66）

2.2 血清中IL-1、TNF-α、PGE2、NF-kB、I-kB的ELISA结果

在醋酸扭体模型中,经尾静脉给予胆碱或/和帕瑞昔布钠后,得血清中IL-1、TNF-α、PGE_2、NF-kB、I-kB的含量(图2)。与S组比较,C组、P组、1/2(C+P)组中IL-1、TNF-α的含量均降低,差异具有统计学意义(P<0.05,P<0.01),且1/2(C+P)组比C组及P组分别单独使用降低更加明显,差异具有统计学意义(P<0.05);P组以及1/2(C+P)组中PGE2含量较对照组均有降低,且差异

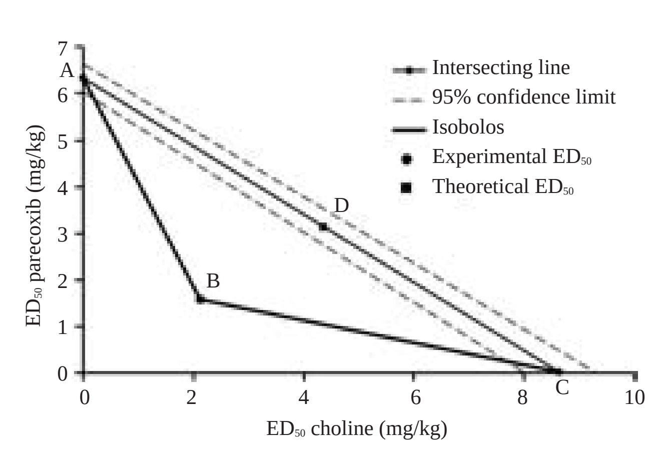


图1 胆碱与帕瑞昔布钠联合用药后的等辐射分析图

Fig.1 Isobolograms for the intravenous administration of the combination choline and Parecoxib. A, C: ED_{50} of parecoxib sodium and choline, respectively; B: Measured ED_{50} of combined used of parecoxib sodium and choline. D: Theoretical ED_{50} of parecoxib sodium and choline combined. B *vs* D P<0.05.

有统计学意义（P<0.05），1/2(C+P)组与C组相比PGE2含量下降更多，且差异有统计学意义（P<0.05）；与S组

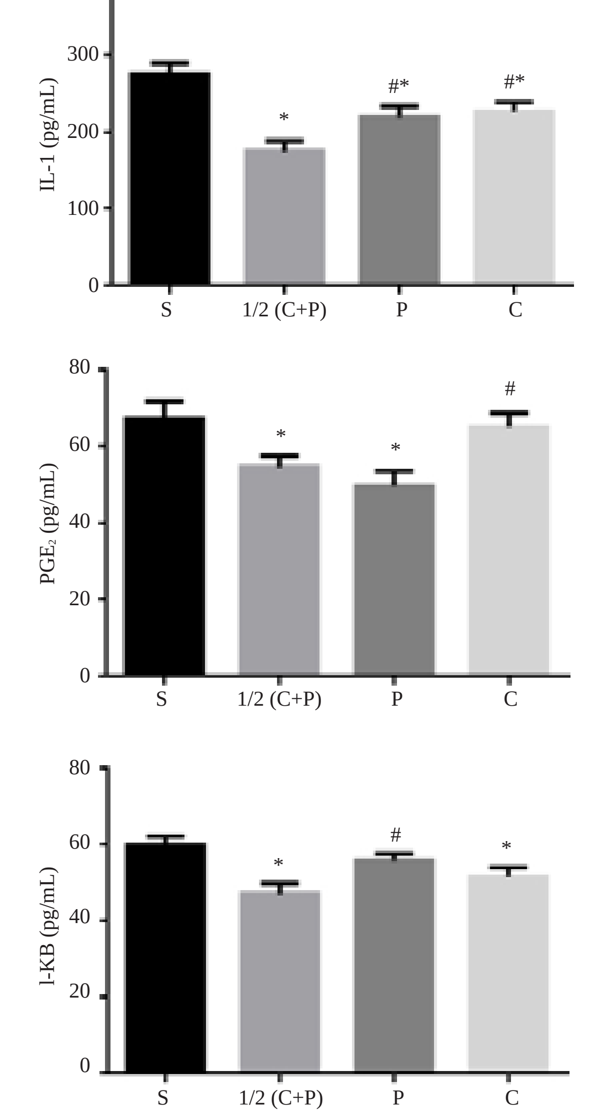
表2 胆碱和帕瑞昔布钠的联合用药指数

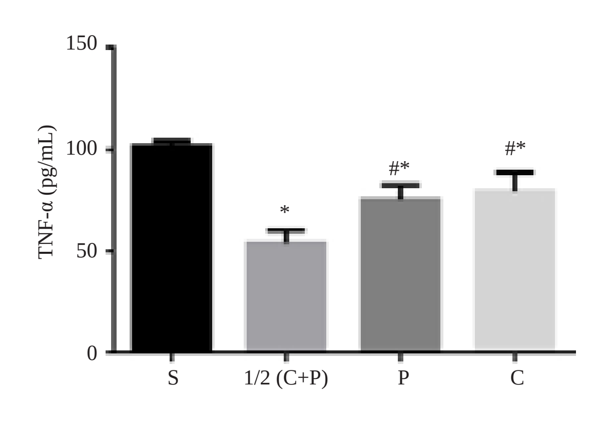
Tab.2 Combination index (CI) values of the combination of choline and Parecoxib

Drug	Combination index values at Drug		
	ED_{50}	ED_{75}	ED_{90}
Choline	N/A	N/A	N/A
Parecoxib	N/A	N/A	N/A
Choline+Parecoxib	0.113 42	0.256 79	0.581 39

CI:<0.9 synergism; 0.9~1.1 additive effect, >1.1 antagonis. N/A: No CI was found.

相比，NF-kB的含量在C组、P组、1/2(C+P)组中均降低且差异有统计学意义（P<0.05，P<0.01），I-kB的含量在1/2（C+P）组及C组中出现有统计学意义的降低，NF-kB、I-kB在1/2(C+P)组中较P组有更明显降低，且差异有统计学意义（P<0.05）；其余各组间差异无统计学意义（P>0.05）。





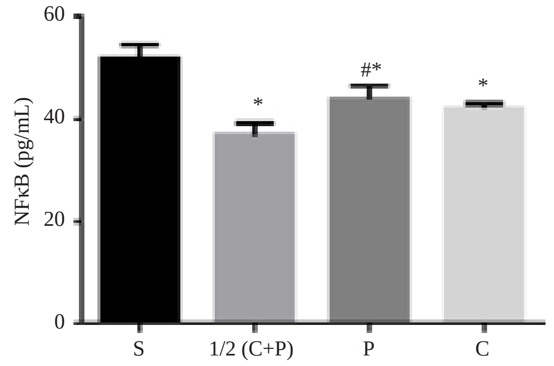


图2 醋酸扭体模型中胆碱与帕瑞昔布钠联合用药的炎性介质的产生

Fig.2 Effects of co-administration with choline and parecoxib on the production of pro-inflammatory mediators in acid writhing model. *P<0.05 *vs* S group; #P<0.05 *vs* 1/2(C+P) group.

3 讨论

帕瑞昔布钠因其高选择性且较少的不良反应而常常与其他镇痛药物联合应用于手术后疼痛的治疗，这不仅能提高镇痛效果，而且显著减少麻醉性镇痛药物的用量，进而减少药物的不良反应[10-11]。有关研究表明帕瑞昔布钠与曲马多在颜面部福尔马林试验的第二阶段具有协同镇痛作用[12]。另有研究显示[13]，胆碱和阿司匹林具有协同抗炎作用，在几种炎性肿胀模型中，胆碱能够增强小剂量阿司匹林的抗炎作用。α7烟碱受体的活化参与了二者的相互作用，但具体机制尚不清楚[13-14]。本研究结果显示联合使用胆碱和帕瑞昔布钠能够产生协同镇痛效果，同时能够降低两药的使用剂量，从而减少其副作用的发生。帕瑞昔布钠作为选择性COX-2抑制剂，其镇痛作用较阿司匹林更为强效，且副作用更少，广泛用于术后多模式镇痛[15]。胆碱作为α7受体特异性激动剂，与烟碱类似，但却不具有物理依赖性，较烟碱具有更加安全可靠的特点[16-17]。

本实验在醋酸扭体疼痛模型中证实两药具有协同作用，通过量效曲线及logistic回归得出两药各自与联合用药的ED_{50}，然后采用等辐射分析法判断二者的相互作用关系，再用联合用药指数加以验证[18]。这一方法已广泛应用于两药相互作用的研究，具有较高的可信度[19]。Brerenbaum[20]曾提出二种及以上的药物联用时，若作用于一个共同通路上的相同或不同关键作用点，协同效应即可以产生，反之将不会产生协同效应。本研究利用量效曲线及logistic回归得出胆碱镇痛的ED_{50}值为8.64 mg/kg，帕瑞昔布钠为6.33 mg/kg，合用时的ED_{50}为胆碱2.13 mg/kg，帕瑞昔布钠1.56 mg/kg。胆碱与帕瑞昔布钠的镇痛效应的ED50和95% 可信区间作等辐射(Isobologram)图，可见实测点B(2.13，1.56)明显落在理论相加线的下方，且95%可信区间不与理论累加点(4.36，3.13)重合，两点作t检验在X轴与Y轴的$P<0.05$，有统计学意义，由此说明两药在等效剂量附近表现出协同效应(图1)。另外胆碱与帕瑞昔布钠的联合用药指数CI分别是ED_{50}为0.11342，ED_{75}为0.25679，ED_{90}为0.58139，其CI值都小于0.9，而CI值<0.9为协同作用，0.9-1.1为相加作用，CI>1.1为拮抗作用。且CI值越低表明协同作用越强。因此这也验证了胆碱与帕瑞昔布钠具有协同作用。

为进一步探究两药产生协同作用的机制，本研究中检测了血中促炎介质IL-1和TNF-α的含量，可以发现1/2ED_{50}量的胆碱与帕瑞昔布钠联用较单独使用能更好的抑制IL-1和TNF-α产生，提示两药联合抗炎性痛可能存在共同的作用机制。单独使用帕瑞昔布钠组中PGE_2的含量较对照组有明显降低，提示帕瑞昔布钠可能主要通过抑制前列腺素的产生来达到抗炎镇痛的效果。单用胆碱组中PGE_2的含量与对照组相比几乎没有改变，而与联合用药组相比则有明显差异，后者有显著降低，提示胆碱在抗炎过程中并不会抑制PGE_2的产生，可能还会使PGE_2的产生增加。在有关动脉粥样硬化发病机理的研究中，香烟烟雾(主要成分为尼古丁)能够增强内皮细胞中组胺和LPS诱导的环氧合酶-2(COX-2)的表达[21]。还有研究也证明尼古丁可以上调COX-2的表达和PGE_2的产生。此外，检测了血中NF-kB及I-kB的水平，发现单独应用胆碱和帕瑞昔布钠以及联合用药组都会降低血中NF-kB含量，且联合用药组较单用药组产生更好的效果，提示二者的共同抗炎作用点可能位于NF-kB。有关于氯胺酮诱导的大鼠溃疡性膀胱炎中增强了NF-kB易位和COX-2表达的研究，此研究中经启动子缺失分析表明NF-kB是COX-2基因活化的必要转录因子。通过NF-kB途径来调节COX-2的表达可以对炎症信号进行调节。还有研究证明COX-2的表达是由NF-kB的活化所介导的[22]。另外，NF-kB结合位点已被确定是在COX-2基因的启动子区[23]。而α7nAChR的抗炎机制则主要是通过激活NF-kB通路，阻止核因子抑制蛋白(I-kB)磷酸化，从而抑制NF-kB的转录活性，进而抑制促炎介质的产生，达到抗炎的作用[24-25]。NF-kB为早期的核转录因子，早期免疫反应和炎症反应的各个阶段都受NF-kB调节。由此，我们可以推测胆碱与帕瑞昔布钠可能共同作用于NF-kB并经NF-kB通路抗炎镇痛。

综上所述，胆碱与帕瑞昔布钠分别对治疗炎性痛有一定的作用。本研究中将胆碱与帕瑞昔布钠联合应用于炎性痛模型中，发现二者具有协同镇痛作用，从而减少帕瑞昔布钠的使用剂量，进而减少其副作用的产生。两药物的相互作用可能是通过NF-kB通路发挥作用，但具体机制还有待进一步研究。

参考文献：

[1] Mitra S, Khandelwal P, Roberts K, et al. Pain relief in laparoscopic cholecystectomy--a review of the current options[J]. Pain Pract, 2012, 12(6): 485-96.

[2] Bianchini C, Malago M, Crema L, et al. Post-operative pain management in head and neck cancer patients: predictive factors and efficacy of therapy[J]. Acta Otorhinolaryngol Ital, 2016, 36(2): 91-6.

[3] Lloyd R, Derry S, Moore RA, et al. Intravenous or intramuscular parecoxib for acute postoperative pain in adults[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2009, 15(2): 47.

[4] 周国斌, 李红英, 吉锦泉, 等. COX抑制剂对神经病理性疼痛大鼠镇痛效果及机制[J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(10): 1764-6.

[5] Polat R, Peker K, Guloksuz CT, et al. Comparison of the postoperative analgesic effects of paracetamol-codeine phosphate and naproxen sodium-codeine phosphate for lumbar disk surgery[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2015, 31(9): 468-72.

[6] Uteshev VV. The therapeutic promise of positive allosteric

modulation of nicotinic receptors[J]. Eur J Pharmacol, 2014, 727: 181-5.

[7] De Simone R, Ajmone-Cat M, Carnevale D, et al. Activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor by nicotine selectively up-regulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in rat microglial cultures[J]. J Neuroinflammation, 2005, 2(1): 4.

[8] 陈 鸿, 潘宁玲, 王国林. 等辐射分析法的原理及应用[J]. 国外医学:麻醉学与复苏分册, 2004, 25(5): 267-9.

[9] Zheng FQ, Xu Y, Yang RJ, et al. Combination effect of oncolytic adenovirus therapy and herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir in hepatic carcinoma animal models[J]. Acta Pharmacol Sin, 2009, 30(5): 617-27.

[10] Sarridou DG, Chalmouki G, Braoudaki MA, et al. Intravenous parecoxib and continuous femoral block for postoperative analgesia after total knee arthroplasty. a randomized, Double-Blind, prospective trial[J]. Pain Physician, 2015, 18(3): 267-76.

[11] 肖金仿, 刘高望, 刘晓军, 等. 帕瑞昔布钠加入多模式镇痛对胸腔镜辅助开胸术后吗啡用量的影响[J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(2): 338-40.

[12] Isiordia-Espinoza MA, Zapata-Morales JR, Castaneda-Santana DI, et al. Synergism between tramadol and parecoxib in the orofacial formalin test[J]. Drug Dev Res, 2015, 76(3): 152-6.

[13] Pan ZY, Wang H. Synergistic interaction between choline and aspirin against acute inflammation induced by carrageenan and lipopolysaccharide[J]. Int Immunopharmacol, 2014, 20(1): 229-37.

[14] Sio SW, Ang SF, Lu J, et al. Substance P upregulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E metabolite by activating ERK1/2 and NF-κB in a mouse model of burn-induced remote acute lung injury[J]. J Immunol, 2010, 185(10): 6265-76.

[15] Mohamad AH, Mcdonnell NJ, Bloor M, et al. Parecoxib and paracetamol for pain relief following minor day-stay gynaecological surgery[J]. Anaesth Intensive Care, 2014, 42(1): 43-50.

[16] Safronova VG, Vulfius CA, Shelukhina IV, et al. Nicotinic receptor involvement in regulation of functions of mouse neutrophils from inflammatory site[J]. Immunobiology, 2016, 221(7): 761-72.

[17] Alsharari SD, Freitas K, Damaj MI. Functional role of alpha7 nicotinic receptor in chronic neuropathic and inflammatory pain: Studies in transgenic mice[J]. Biochem Pharmacol, 2013, 86(8, SI): 1201-7.

[18] Pinardi G, Prieto JC, Miranda HF. Analgesic synergism between intrathecal morphine and cyclooxygenase-2 inhibitors in mice[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2005, 82(1): 120-4.

[19] Pazhang Y, Jaliani HZ, Imani MA. Synergism between NF-kappa B inhibitor, celastrol, and XIAP inhibitor, embelin, in an acute myeloid leukemia cell line, HL-60[J]. J Cancer Res Ther, 2016, 12(1): 155-60.

[20] Berenbaum MC. What is synergy[J]. Pharmacol Rev, 1989, 41(2): 93-141.

[21] Barua RS, Sharma M, Dileepan KN. Cigarette smoke amplifies inflammatory response and atherosclerosis progression through activation of the H1R-TLR2/4-COX2 axis[J]. Front Immunol, 2015, 6: 572.

[22] Kojima M, Morisaki T, Izuhara K, et al. Lipopolysaccharide increases cyclo-oxygenase-2 expression in a colon carcinoma cell line through nuclear factor-kappa B activation[J]. Oncogene, 2000, 19(9): 1225-31.

[23] Pelissier-Rota MA, Pelosi L, Meresse P, et al. Nicotine-induced cellular stresses and autophagy in human cancer colon cells: A supportive effect on cell homeostasis via up-regulation of Cox-2 and PGE(2) production[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2015, 65: 239-56.

[24] Ye Y, Liu R, Cheng W, et al. GTS-21 attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine production *in vitro* by modulating the Akt and NF-κB signaling pathway through the α7 nicotinic acetylcholine receptor[J]. Int Immunopharmacol, 2015, 29(2): 504-12.

[25] Niranjan R, Nath C, Shukla R. Melatonin attenuated mediators of neuroinflammation and alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor mRNA expression in lipopolysaccharide (LPS) stimulated rat astrocytoma cells, C6[J]. Free Radic Res, 2012, 46(9): 1167-77.

(编辑:经 媛)